



TITLE:

Development of Electrostatic and Three-Dimensional Random Orientation Models for Enzyme-Electrode Interfaces in Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Sugimoto, Yu

CITATION:

Sugimoto, Yu. Development of Electrostatic and Three-Dimensional Random Orientation Models for Enzyme-Electrode Interfaces in Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis. 京都大学, 2017, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20426>

RIGHT:

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	杉本 悠
論文題目	Development of Electrostatic and Three-Dimensional Random Orientation Models for Enzyme-Electrode Interfaces in Direct Electron Transfer-Type Bioelectrocatalysis (直接電子移動型酵素電極反応における酵素-電極界面の静電相互作用および三次元ランダム配向モデルの構築)		
(論文内容の要旨)			
<p>直接電子移動（DET）型の酵素電極反応では、酵素の酸化還元中心と電極間で直接的な電子授受が行われる。DET型酵素電極反応は、系が単純で、酵素-電極間の電子移動に関わる熱力学的エネルギーロスがなく、バイオセンサやバイオ電池等のバイオ電気化学デバイスへの応用が強く期待されている。しかし、ほとんどの酵素は酸化還元中心がポリペプチド（絶縁体）に覆われているため、電極とは容易に反応できず、DET型酵素電極反応の観測例は限られている。多種多様の酸化還元酵素をDET型反応系に有効に組み入れるには、DET型酵素電極反応の反応機構を解明することが必要である。これまでの研究より、DET型反応活性は酵素の酸化還元中心と電極間の距離に大きく依存することが分かっている。この距離が長くなるにつれてDET活性は指数関数的に減少し、20 Å以上離れた場合DET活性は観測できなくなる。このため、酸化還元中心と電極間の距離が短くなるような配向で、酵素が電極に吸着することが重要である。実際、配向を制御することによりDET活性を向上したという報告もなされている。このようにDET型反応機構に関しては、部分的に理解された現象もあるが、電極表面電荷や電極表面官能基が酵素のDET活性や安定性に及ぼす効果や、炭素、金、多孔質電極といった電極素材により電子移動速度が変化する原因は明らかにはされていない。そこで本研究では、酵素と電極間の静電相互作用および電極の多孔質構造がDET型の触媒電流-電圧曲線に与える影響を実験的に明らかにし、その影響を説明できるモデルを提唱することを目的とした。</p> <p>第1章では、DET型酵素電極反応による限界定常電流値（i_s^{lim}）を指標として、酵素-電極界面の静電相互作用が酵素の吸着配向や安定性に及ぼす影響を調べた。その結果、酵素吸着時の電極表面電荷密度が正または負に大きく増大すると、i_s^{lim}が小さくなることを見出した。ただし、酸化還元中心が負に荷電している酵素の場合、正の電極表面電荷がある程度存在する場合に i_s^{lim} が最大となった。一方、金電極表面に自己組織化単分子膜（SAM）を形成した場合、酵素吸着時の電極表面電荷密度にかかわらず、i_s^{lim} はほぼ一定となることを示した。これらの現象は電極界面近傍に形成される電気二重層内での電場と酵素の電荷との静電相互作用によるものと予想し、電極近傍の電位分布を計算した。SAMを形成していない電極の場合、電極の表面電荷密度の増大とともに、電極界面近傍の電場が非常に大きくなる。酵素の結晶構造から酵素表面の静電ポテンシャルを計算し、電気二重層内での酵素と電場との静電相互作用を求めたところ、その静電相互作用の大きさとDET型の反応活性に相関があることがわかった。一方、SAMを形成した電極の場合、電極表面電荷の大きさにかかわらず、電場は</p>			

SAM内部に集中しており、酵素はSAM内部に侵入できないため強い電場にさらされることなく、電極表面電荷のDET活性に及ぼす影響は極めて小さくなると結論した。これらの結果から、酵素は電気二重層内の静電相互作用に依存して配向吸着するため、吸着電位により界面電子移動速度距離に差が生じ、 i_s^{lim} の電位依存性ができることと結論した。また、より強い電場の中では、酵素は不可逆的に失活変性することも示された。

第2章では、第1章で得た静電相互作用の知見を利用して、酵素-低分子基質界面、および酵素-タンパク質界面の静電相互作用が電子移動速度に及ぼす影響を調べた。静電相互作用を調べるために、二次反応速度定数のイオン強度依存性を測定した。速度定数は電荷の符号、および電荷の大きさにより特徴的なイオン強度依存性を示した。相互作用部位周辺の電荷だけを考慮した電位分布モデル上で、遷移状態反応速度論とポアソン・ボルツマン方程式を適用したシミュレーションを行うことにより、これらの実験結果を再現することに成功した。これより、タンパク質のような大きな多価イオンが関与する反応の長距離型の静電相互作用でも、相互作用部位周辺の電荷のみが重要であることを明らかにした。

第3章では、多孔質電極の構造がDET反応に与える影響を調べた。多孔質電極を用いた場合に、平板電極に比べ大きな触媒電流が観測される現象が、これまでもいくつか観測されていた。しかし、この現象や、観測される触媒電流-電圧曲線の形状は、従来から指摘されている電極表面積の増加という因子では説明できない。そこでこれら現象を説明するために、酵素の半径 r と多孔質電極の細孔半径 R_p との相対関係を考慮したランダム配向吸着モデルを考案した。ここでは簡単のため、酵素と細孔はともに球体と近似し、酵素はこの細孔内にランダムに吸着し、酵素の酸化還元中心から電極までの最短距離 r_{as} で長距離電子移動するというモデルを用いた。本モデルをもとに、DET型酵素電極反応による定常状態の触媒電流-電圧曲線の半解析式を導出した結果、 R_p が r に近づくことにより、DETに適した配向の酵素の分布が多くなり、平板電極に比べ大きな触媒電流が得られることを明らかになった。さらに、酵素の結晶構造から見積もった r と r_{as} を用いて、実験的に平板電極と多孔質電極において得られた触媒電流-電圧曲線をよく再現できた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

酸化還元酵素と電極間で直接的に電子授受する直接電子移動 (DET) 型酵素電極反応は、系が単純で理論上は熱力学的エネルギーロスがないため、様々なバイオ電気化学デバイスへの応用が期待されている。しかし、多くの酸化還元酵素は活性中心がポリペプチドに覆われているため、界面電子移動の速度論的エネルギーロスが大きく、DET型反応の観測例の数は限られている。より多くの酸化還元酵素をDET型酵素電極反応に有効に組み入れるためには、DET反応機構の解明が必要である。これまでの研究より、DET型界面電子移動速度は酵素の酸化還元活性中心と電極間の距離に依存することが分かっているが、電極表面電荷や電極表面官能基がDET活性に及ぼす効果や、炭素、金、多孔質電極といった電極素材によるDET活性の違いなどは未解明のままである。

本論文では、酵素と電極の表面電荷に着目し、静電相互作用が酵素のDET型活性や安定性に及ぼす影響を実験的に調べるとともに、静電相互作用エネルギーの理論計算と対比して酵素の吸着配向性を考察した。また、球形細孔内への酵素のランダム配向吸着モデルを考案し計算したところ、DET型活性に及ぼす細孔半径の影響に関する実験結果をよく説明できた。本論文で評価できる点は以下の通りである。

1. DET型酵素電極反応の定常電流密度と電極の表面電荷密度との関係を、酵素の表面電荷と電気二重層内の電場との静電相互作用という観点で検討した結果、静電相互作用が、酵素の吸着配向と安定性に大きく影響することを明らかにした。
2. 酵素-低分子基質界面、および酵素-タンパク質界面の静電相互作用を、二次反応速度定数のイオン強度依存性から評価し、実験結果を再現できる物理化学的モデルを提唱した。また、こうした静電相互作用では相互作用部位周辺の局所的な電荷の寄与が極めて大きいことを明らかにした。
3. 多孔質電極の細孔と酵素を球形近似した上で、酵素の細孔内へのランダム配向と長距離電子移動反応モデルを考案し、DET反応における定常状態ボルタモグラムの半解析式を導出した。これにより、多孔質電極の細孔径を酵素半径程度まで減少させるとDET型反応できる配向の酵素の割合が多くなり、触媒電流が増加することを定量的に示した。また、酵素の結晶構造から見積もられる酵素サイズを用いて平板電極と多孔質電極の実験結果を再現できた。

以上のように、本論文は、DET反応における静電相互作用、および多孔質電極の細孔サイズ効果を再現するモデルを構築し、実験結果を定量的に説明できることを示したものであり、このモデルは今後のバイオ電気化学デバイスの開発においても有用となると考えられ、生物電気化学、材料科学、酵素科学の発展に寄与するところが多い。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成29年2月10日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)